

⑮ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 196 11 769 A 1**

⑳ Aktenzeichen: 196 11 769.0
㉑ Anmeldetag: 14. 3. 96
㉒ Offenlegungstag: 18. 9. 97

⑤① Int. Cl.⁶:
A 61 K 49/00

A 61 K 31/34
C 08 B 37/08
C 08 F 251/00
C 08 B 35/00
C 08 B 30/20
C 08 B 37/08
C 13 K 13/00

DE 196 11 769 A 1

⑦① Anmelder:
Schering AG, 13353 Berlin, DE

⑦② Erfinder:
Rößling, Georg, Dr., 13465 Berlin, DE; Albayrak,
Celal, Dr., 10999 Berlin, DE; Tack, Johannes, Dr.,
13595 Berlin, DE

⑤⑥ Entgegenhaltungen:
EP 04 58 745 A1

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Mikropartikel, Verfahren zu deren Herstellung, sowie deren Verwendung in der Ultraschall Diagnostik

⑤⑦ Die Erfindung betrifft gasenthaltende Mikro- und Nano-
partikel aus bioabbaubaren, synthetischen Polymeren auf
Basis hydrophobisierter Polysaccharide, diese Partikel ent-
haltende Mittel für die Ultraschalldiagnostik, sowie Verfah-
ren zur Herstellung der Partikel und Mittel.

DE 196 11 769 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 07. 97 702 038/574

8/29

Die Erfindung betrifft den in den Patentansprüchen gekennzeichneten Gegenstand, daß heißt gasenthalten- de Mikro- und Nanopartikel aus bioabbaubaren, syn- thetischen Polymeren auf Basis hydrophobisierter Poly- saccharide, diese Partikel enthaltende Mittel für die Ultraschalldiagnostik, sowie Verfahren zur Herstellung der Partikel und Mittel.

Die Ultraschalldiagnostik hat in der Medizin wegen der komplikationslosen und einfachen Handhabung sehr breite Anwendung gefunden. Ultraschallwellen werden an Grenzflächen von Medien unterschiedlicher akustischer Dichte reflektiert. Die dabei entstehenden Echosignale werden elektronisch verstärkt und sichtbar gemacht.

Die Darstellung von Blutgefäßen und inneren Organen mittels Ultraschall erlaubt im allgemeinen nicht die Darstellung des Blutflusses. Flüssigkeiten, insbesondere Blut, liefern nur dann Ultraschallkontrast, wenn Dichte- und Kompressibilitätsunterschiede zur Umgebung be- stehen. Als Kontrastmittel werden in der medizinischen Ultraschalldiagnostik in der Regel gasenthaltende oder gasproduzierende Substanzen verwendet. Gase sind in- sofern besonders geeignet, da hier der Impedanzunter- schied zwischen Gas und umgebendem Blut wesentlich größer ist, als er für Flüssigkeiten oder Festkörper be- obachtet wird [Levine R. A., J. Am. Coll. Cardiol. 3 (1988) 28 oder Machi I. J., CU 11 (1983) 3].

Es ist bekannt, daß durch Injektionen von Lösungen, die feine Gasblasen enthalten kardiale Echokontaste erzielt werden können [Roelandt J., Ultrasound Med. Biol. 8 (1982) 471—492]. Diese Gasblasen werden in physiologisch verträglichen Lösungen z. B. durch Schüt- teln, anderer Agitation oder durch Zusatz von Kohlen- dioxid erhalten. Sie sind jedoch hinsichtlich Anzahl und Größe nicht standardisiert und können nur unzulänglich reproduziert werden. Auch sind sie in der Regel nicht stabilisiert, so daß ihre Lebensdauer gering ist. Ihre mitt- leren Durchmesser liegen meist über Erythrozytengrö- ße, so daß eine Lungenkapillarpassage mit nachfolgen- der Kontrastierung von Organen wie linkes Herz, Le- ber, Niere oder Milz nicht möglich ist. Darüber hinaus eignen sie sich nicht für Quantifizierung, da sich das von ihnen erzeugte Ultraschallecho aus mehreren, nicht voneinander zu trennenden Prozessen wie Blasenent- stehung, Koaleszenz und Auflösung zusammensetzt. So ist es z. B. nicht möglich mit Hilfe dieser Ultraschallkon- trastmittel über die Messung des Kontrastverlaufs im Myokard Aussagen über Transitzeiten zu gewinnen.

Hierzu sind Kontrastmittel notwendig, deren Streu- körper eine ausreichende Stabilität aufweisen.

In der EP 0 131 540 ist die Stabilisierung von Gasbla- sen durch Zucker beschrieben. Damit wird die Reprodu- zierbarkeit und Homogenität des Kontrasteffektes ver- bessert, eine Lungenpassage überstehen diese Blasen jedoch nicht.

In EP 0 122 624 und 0 123 235 wird beschrieben, daß der gasblasenstabilisierende Effekte von Zuckern, Zuk- keralkoholen und Salzen durch Zusatz von grenzflä- chenaktiven Substanzen verbessert wird. Eine Lungen- kapillargängigkeit und die Möglichkeit zur Darstellung des arteriellen Gefäßraums und verschiedener Organe wie Leber oder Milz ist bei diesen Ultraschallkontrast- mitteln gegeben. Der Kontrasteffekt ist hierbei jedoch auf das Gefäßvolumen beschränkt, da die Bläschen nicht von den Gewebezellen aufgenommen werden.

Keines der beschriebenen Ultraschallkontrastmittel

verbleibt längere Zeit unverändert im Körper. Eine Or- gandarstellung mit ausreichender Signalintensität durch selektive Anreicherung nach i.v. Gabe oder Quantifizie- rung sind mit diesen Mitteln nicht möglich.

Eine Verkapselung von Gasen wie beispielsweise Luft in Partikeln und deren Verwendung als Ultraschall- kontrastmittel wird in der EP 0 224 934 beschrieben. Das hierbei verwendete Wandmaterial besteht aus Pro- tein, insbesondere menschliches Serumalbumin mit den bekannten allergenen Eigenschaften, zu denen durch ei- ne Denaturierung zytotoxische Effekte hinzukommen können.

In der europäischen Patentanmeldung EP 0 398 935 werden gasenthaltende Mikropartikeln für die Ultra- schall-Diagnostik auf der Basis von biologisch abbauba- ren, synthetischen Materialien beschrieben. Diese Mit- tel weisen eine ausreichende in vivo Lebensdauer auf und werden nach intravenöser Applikation intrazellulär im retikuloendotheliales System und damit auch in der Leber oder Milz angereichert.

In der europäischen Patentanmeldung EP 0 454 044 werden Ultraschallkontrastmittel auf der Basis hydro- phobisierter Polysaccharide beschrieben. Verwendet werden dabei ausschließlich hochmolekulare, gemischte Polyelektrolytkomplexe. Derartige Komplexe weisen in Lösung jedoch einen höheren osmotischen Druck auf als er für ungeladene Verbindungen gemessen wird, dar- über hinaus zeigen geladene Komplexe in der Regel eine schlechtere in vivo Verträglichkeit als ungeladene Verbindungen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher Ultraschallkontrastmittel zu finden, die die Nachteile des Standes der Technik überwinden, d. h. Kontrastmit- tel zu finden, die

- einen deutlichen Kontrast zum umgebendem Gewebe liefern,
- die so klein und stabil sind, daß sie ohne wesent- lichen Gasverlust und im wesentlichen quantitativ die linke Herzhälfte nach intravenöser Applikation erreichen,
- gegebenenfalls lange im Blutkreislauf zirkulie- ren,
- gute Verträglichkeit aufweisen ohne allergenes Potential zu besitzen,
- nicht im Wasser oder Blut miteinander aggregie- ren und
- sich schnell und einfach herstellen lassen.

Die Aufgabe wird durch die vorliegende Erfindung gelöst.

Es wurde gefunden, daß Mikropartikel bestehend aus hydrophobisierten Polysacchariden und einem Gas her- vorragend zur Herstellung eines Präparates für die Ultraschalldiagnostik geeignet sind.

Die erfindungsgemäßen gasgefüllten, echogene Poly- mernano- oder Mikropartikel (nachfolgend auch als Partikel oder Mikropartikel bezeichnet) bestehen aus bioabbaubaren, synthetischen Polymeren auf der Basis hydrophobisierter Polysaccharide und haben den Vor- teil, daß sie in vivo leicht und ohne toxikologisch be- denkliche Abbauprodukte abgebaut werden. Darüber hinaus können ihre lipophilen Eig nschaft n in weiten Bereichen über den Veresterungs bzw. Veretherungs- grad leicht variiert werden, wodurch die Verweilzeit im Blutkreislauf, aber auch das Verteilungsverhalten ge- steuert werden kann.

Da die Wandstärke der erfindungsgemäßen Mikro-

partikel durch den Herstellungsprozeß beeinflussbar ist, kann man Partikel herstellen, deren Schwingungsmoden sich durch das Schallfeld anregen lassen, wodurch eine Anwendung auch in nichtlinearen Abbildungsmodi möglich ist.

Die erfindungsgemäßen Mikropartikel sind aufgebaut aus hydrophobisierten Polysacchariden. Beispielsweise genannt seien Derivate der Hyaluronsäure, des Dextrans, des Pullans, des Amylopektins, der Amylose, des Mannans und/oder des Chitosans, wobei funktionelle Gruppen durch Propyl-, Isopropyl-, Butyl-, Isobutyl-, Pentyl-, Isopentyl-, Hexyl-, Octyl-, Decyl-, Dodecyl-, Palmitoyl-, Stearinoyl-, Lauryl- und/oder Benzylgruppen ganz oder teilweise hydrophobisiert, d. h. verestert oder verethert sind.

Der Veresterungsgrad bzw. Veretherungsgrad (nachfolgend auch allgemein als Substitutionsgrad bezeichnet) wird in der vorliegenden Schrift in Prozent angegeben, wobei von einer 100%igen Veresterung (Veretherung) gesprochen wird, wenn alle funktionellen Gruppen (d. h. Carboxyl- oder Hydroxylgruppen) des Polysaccharids verestert (verethert) sind. Erfindungsgemäß bevorzugt ist ein Substitutionsgrad von 30–100%.

Über den Substitutionsgrad läßt sich die Hydrophilie der Partikel steuern und damit die Verweilzeit im Blut beeinflussen. Allgemein gilt: Je hydrophiler die Partikel desto länger ist die Verweilzeit im Blutkreislauf.

Auch reichern sich die lipophileren Partikel vorzugsweise in Organen wie z. B. der Leber an, wohingegen Partikel mit geringerer Lipophilie vorzugsweise im Gefäßraum verbleiben.

Erfindungsgemäß bevorzugt sind weiterhin Polymere mit einem Molekulargewicht von 10–250 kDalton.

Erfindungsgemäß einsetzbare Hyaluronsäureester mit dem gewünschten Molekulargewicht und Veresterungsgrad können nach den folgenden literaturbekannten Verfahren hergestellt und charakterisiert werden:

- Jeanloz et al, *Biol. Chem.* 186, (1950) 495–511
- Jeanloz et al, *J. Biol. Chem.* 194 (1952) 141–150
- Jeanloz et al, *Hel. Chim. Act.* 35 (1952) 262–271
- Jager et al, *J. Bacteriology.* (1979) 1065–1067
- US 4,851,521
- Kawaguchi et al, *Carbohydr. Polym.* 18 (1992) 139–141
- Prestwich et al, *Bioconjugate Chem.* 5 (1994) 339–347
- Prestwich et al, *Bioconjugate Chem.* 5 (1994) 370–372
- Prestwich et al, *Bioconjugate Chem.* 2 (1991) 232–241
- Chabreck et al, *J. Appl. Polym. Symp.* 48 (1993) 20–22
- Kobajashi et al, *Biorheology* 31 (1994) 235–244

Erfindungsgemäß einsetzbare(s), hydrophobisierte(s) Dextrane, Pullulan, Amylopektin, Amylose, Mannan, Chitosan oder Chitin können (kann) nach den folgenden literaturbekannten Verfahren hergestellt und charakterisiert werden:

- Suzuki. M et al, *Carbohydr. Res.* 23 (223–229) 1977
- Hämmerling U. et al, *Biochimica et Biophysica Acta* 875 9 (1986) 265–270
- Kobojashi. K. et al, *Makromolecules* 19 (1986) 529–535
- Ringsdorf H. et al, *Angew. Makromol. Chem.*

166/167 (1989) 71–80

— Sunamoto J. et al, *CRC Critical Reviews in Therapeutic drug Carrier Systems* 2 (1986) 117–136

— Ringsdorf H. et al, *Angew. Chem. Int. ed. Engl.* 27 (1988) 113

— Toshihiro S. et al, *Makromol. Chem.* 192 (1991) 2447–2461

Als in den Partikeln enthaltene Gase kommen neben den üblichen Gasen wie Luft, Stickstoff und Edelgasen auch perfluorierte Verbindung in Frage.

Eine weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Mikropartikel aus hydrophobisierten Polysacchariden.

Zur Herstellung von Mikropartikeln verfährt man in der Weise, daß man das jeweilige Polymer, sowie gegebenenfalls eine oberflächenaktive Substanz in einem organischen Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemisch löst. In dieser Lösung wird eine Perfluoro-Verbindung oder Wasser dispergiert. Die Dispersion wird in Wasser, das gewünschtenfalls eine oberflächenaktive Substanz enthält, gegeben und mit Hilfe eines Rührers dispergiert. Das Lösungsmittel wird durch Gaseinleitung (z. B. Stickstoff) und gegebenenfalls Anlegen eines Vakuums entfernt. Dabei bilden sich Partikel aus, die zunächst noch Wasser bzw. die flüssige Perfluoro-Verbindung enthalten. Anschließend wird die Partikel enthaltende Suspension mit einem geeigneten pharmazeutisch akzeptablen Kyroprotektor vermischt und gefriergetrocknet, wobei die in den Partikeln befindliche Flüssigkeit weitgehend entweicht und nach Belüften des Lyophilisators durch das gewünschte Gas (in der Regel Luft) ersetzt wird. Je nach Trocknungsdauer verbleibt gegebenenfalls eine geringe Menge der Flüssigkeit (Wasser bzw. Perfluoro-Verbindung) als Dampf in den Partikeln.

Als perfluorierte flüssige Verbindungen kommen zur Anwendung Perfluoropentan, Perfluorohexan, Perfluoro-1,3-dimethylcyclohexan, Perfluorocyclohexan, Perfluorodecalin und/oder Perfluoroether.

Als organische Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemische werden bevorzugt Dichlormethan, Aceton, Ethylacetat, Methylacetat, Triacetin, Triethylcitrat, Ethylactat, Methylactat, Propylacetat, Isopropylacetat, Propylformiat, Butylformiat und/oder Dimethylsulfoxid verwendet.

Als oberflächenaktive Substanz wird bevorzugt eine Substanz aus der Gruppe der Poloxamere®, Poloxamine®, Polyethylenglycolalkylether, Polysorbate, Saccharoseester (Sisterna®, The Netherlands), Saccharoseester (Ryoto Sugarester®, Tokyo) sowie Gelatine, Polyvinylalkohol, Polyvinylpyrrolidon, Fettalkoholpolyglycosid, Chaps (Serva), Chap (Calbiochem), Chapso (Calbiochem), Decyl-β-D-glycopyranosid, Decyl-β-D-maltopyranosid, Natriumoleat, Polyethylenglykol oder deren Gemische eingesetzt.

Die Herstellung der gebrauchsfertigen, injizierbaren Zubereitungen der erfindungsgemäßen Partikeln erfolgt durch Resuspendieren des Lyophilisats in einem pharmazeutisch akzeptablen Suspensionmedium. Geeignete Suspensionsmedien sind z. B. Wasser p.i., wäßrigen Lösungen eines oder mehrerer anorganischer Salze wie z. B. physiologische Elektrolyt- oder Pufferlösungen, wie z. B. Tyrode, wäßrige Lösungen von Mono- oder Disacchariden wie Glucose oder Lactose, Zuckeralkoholen wie Mannit, die gegebenenfalls zusätzlich noch eine oberflächenaktive Substanz aus der Gruppe der Polysorbate, Polysaccharide, Poloxamere® oder Poloxamine® sowie Polyvinylpyrrolidon, Saccharos Mono-

oder Diester und/oder einen physiologisch verträglichen mehrwertigen Alkohol, wie z. B. Glycerin, enthalten.

Bevorzugt ist jedoch für Injektionszwecke geeignetes Wasser.

Um die Sicherheit der Applikation zu erhöhen, kann unmittelbar vor der Injektion eine Filtration der Suspension durchgeführt werden.

Die erfindungsgemäßen Mittel enthalten 10^6 – 10^{10} Partikel pro Milliliter Suspensionsmedium. Die injizierte Dosis ist abhängig vom jeweiligen Verwendungszweck; sie liegt bei ultraschalldiagnostischen Untersuchungen der Gefäße im Bereich 1 bis 500 µg, bevorzugt zwischen 10 und 100 µg Partikel/kg Körpergewicht, bei der Untersuchung von Leber und Milz mittels Farbdopplersonographie im Bereich von 50 bis 1000, bevorzugt zwischen 200 und 600 µg/kg Körpergewicht.

Die erfindungsgemäßen Mikropartikel und daraus hergestellte Ultraschallkontrastmittel zeichnen sich durch die folgenden Vorteile aus:

- Sie werden schnell in vivo abgebaut,
- Abbauprodukte sind toxikologisch unbedenklich,
- sie zirkulieren ausreichend lange im Blutkreislauf, wobei die Verweilzeit über den Substitutionsgrad gesteuert werden kann,
- sie sind in allen Modi der Ultraschalldiagnostik, insbesondere auch bei Modi bei denen nichtlineare Effekte ausgenutzt werden, anwendbar,
- sie sind gut verträglich,
- sie zeigen eine einheitliche, steuerbare Größenverteilung,
- sie sind leicht herstellbar,
- sie sind ausreichend stabil um auch eine Lungenpassage zu überstehen und eignen sich damit auch für die Kontrastierung des linken Herzens und
- sie werden vom retikuloendothelialen System aufgenommen und eignen sich damit auch für die Kontrastierung der Leber und Milz.

Die Partikel zeigen darüber hinaus einen hervorragenden Rückstreukoeffizienten. Die Bestimmung der Rückstreukoeffizienten — die als ein Maß für die Effektivität des Kontrastmittels angesehen werden können — erfolgte in einem in vitro Versuchsaufbau, bei dem der von einem in einer Küvette befindlichen Kontrastmittel verursachte "backscatter" gemessen wird (siehe "Standardisation of the measurement of acoustical parameters of ultrasound contrast agents" First European Symposium on Ultrasound Contrast Imaging, January 25–26, 1996, Rotterdam).

Die Bestimmung der Teilchenzahl erfolgte nach der Coulter-Counter-Methode.

Die nachfolgenden Beispiele dienen der näheren Erläuterung des Erfindungsgegenstandes, ohne ihn auf diese beschränken zu wollen.

Beispiel 1

3,0 g Hyaluronsäurebenzylester, bei dem alle Carboxylgruppen sind verestert (MW = 160 kDal) wird in 40 ml Methylchlorid gelöst. 10 ml Perfluoropentan wird mittels Ultraturrax [10 000 Umdrehungen pro Minute (UPM)] 2 Minuten lang in der Polymerlösung dispergiert. Die entstandene (O/O)-Emulsion wird in 400 ml einer 2%igen Polyvinylalkohol-Lösung (PVA-Lösung), die auf 0°C temperiert ist, mittels mechani-

schen Rührers (Dispermat FT, VMA-Getzmann GmbH) 30 Minuten lang bei 10 000 UPM dispergiert. Die (O/O/W) Emulsion wird in einem Dreihalskolben, versehen mit einem Rührer (300 UPM), überführt und es wird 3 h lang bei 20°C durch N₂-Einleitung und durch Vakuum das Lösungsmittel entfernt. Anschließend wird die Suspension durch Ultrafiltration von dem eingesetzten Tensid und dem Restlösungsmittel befreit, daß Volumen der Suspension auf ein Minimum (50 ml) eingengt, die Suspension mit einem pharmazeutisch akzeptablen Kyroprotektor versetzt und gefriergetrocknet.

Das in Wasser resuspendierte Lyophilisat enthält Mikropartikel (Durchmesser von 0,1–8 µm) und zeigt einen hervorragenden in vitro Rückstreukoeffizienten $\alpha_s = 2,5 \times 10^{-1}$ (dB/cm), bei 5 MHz Senderfrequenz und einer Teilchenkonzentration $c = 4,0 \times 10^6$ T/ml.

Beispiel 2

Es wird wie in Beispiel (1) verfahren, wobei Perfluoropentan durch Perfluorohexan ersetzt wird. Das in Wasser resuspendierte Lyophilisat enthält ultraschallaktive Mikropartikel mit einem Durchmesser von 0,1 bis 8 µm.

Beispiel 3

Es wird wie in Beispiel (1) verfahren, wobei der eingesetzte polymere Hyaluronsäurebenzylester einen Veresterungsgrad von 75% besitzt und als Lösungsmittel 40 ml Methylchlorid/Essigsäureethylester (Volumenanteil 2 : 1) eingesetzt wird. Das in Wasser aufgenommene Lyophilisat enthält ultraschallaktive Mikropartikel mit einem Durchmesser von 0,1 bis 8 µm.

Beispiel 4

Es wird wie in Beispiel (1) verfahren, wobei der Polymere Hyaluronsäurebenzylester in 40 ml Methylchlorid/Dimethylsulfoxid (DMSO) (Volumenanteil 2 : 1) gelöst wird. Die in einer 0,9% NaCl-Lösung resuspendierten Partikel zeigen einen in vitro Rückstreukoeffizienten $\alpha_s = 2,3 \times 10^{-1}$ (dB/cm), bei 5 MHz Senderfrequenz und einer Teilchenkonzentration $c = 3,6 \times 10^6$ T/ml und haben einen Durchmesser von 0,5 bis 8 µm.

Beispiel 5

Es wird wie in Beispiel (1) verfahren, wobei als Polymer Hyaluronsäurepentylester (Veresterungsgrad 100%, MW = 250 kDal), gelöst in 40 ml Methylchlorid/Ethylactat (Volumenanteil 2 : 1), eingesetzt wird. Das in einer 5,5%igen Mannitol-Lösung aufgenommene Lyophilisat enthält ultraschallaktive Mikropartikel mit einem Durchmesser von 0,1–6 µm.

Beispiel 6

Es wird wie in Beispiel (1) verfahren, wobei als Polymer Hyaluronsäurepalmitylester (Veresterungsgrad 50%, MW = 150 kDal) eingesetzt wird. Das in Wasser resuspendierte Lyophilisat enthält ultraschallaktive Mikropartikel mit einem Durchmesser von 0,3–8 µm.

Beispiel 7

Es wird wie in Beispiel (1) verfahren, wobei das Polymer Hyaluronsäurebenzylester durch Hyaluronsäuredodecylester (Veresterungsgrad 75%, MW = 50 kDal)

ersetzt wird. Das in einer 0,9%igen NaCl-Lösung resuspendierte Lyophilisat enthält ultraschallaktive Mikropartikel mit einem Durchmesser von 0,3–7 µm.

0,1 bis 7 µm.

Beispiel 8

3,0 g Palmitoyldextran (Substitutionsgrad 35%, MW = 10–12 kDal) wird in 40 ml Methylenchlorid/Isopropylacetat (Volumenanteil 2 : 1) gelöst. 10 ml Perfluoropentanon wird mittels Ultraturrax (10 000 UPM) 2 Minuten lang in der Polymerlösung dispergiert. Die entstandene (O/O)-Emulsion wird in 400 ml 2% PVA-Lösung, die auf 0°C temperiert ist, mittels mechanischen Rührers (Dispermat FT, VMA-Getzmann GmbH) 30 Minuten lang bei 10 000 UPM dispergiert. Die (O/O/W) Emulsion wird in einen Dreihalskolben, versehen mit einem Rührer (300 UPM), überführt und 3 h lang bei 20°C durch N₂-Einleitung und durch Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Anschließend wird die Suspension durch Ultrafiltration von dem eingesetzten Tensid und Restlösungsmittel befreit, das Volumen der Suspension auf ein Minimum (50 ml) eingeengt und die Suspension mit einem pharmazeutisch akzeptablen Kryo-
protektor versetzt und gefriergetrocknet.

Das in Wasser resuspendierte Lyophilisat enthält Mikropartikel mit einem Durchmesser von 0,1 bis 8 µm und zeigt einen hervorragenden in vitro Rückstreu-
koeffizienten $\alpha_s = 2,0 \times 10^{-1}$ (dB/cm), bei 5 MHz Senderfrequenz und einer Teilchenkonzentration $c = 4,0 \times 10^6$ T/ml.

Beispiel 9

Es wird wie in Beispiel (8) verfahren, wobei als Polymer 3,0 g Bernsteinsäuremono-N,N-bis(octadecyl)amin-
dextran (Substitutionsgrad 20%; MW = 8 kDal) und als Lösungsmittel 40 ml Methylenchlorid eingesetzt wird.

Das in Wasser resuspendierte Lyophilisat enthält ultraschallaktive Mikropartikel mit einem Durchmesser von 0,1 bis 6 µm.

Beispiel 10

Es wird wie in Beispiel (8) verfahren, wobei als Polymer 3,0 g Palmitoylpullan (Substitutionsgrad 30%; MW = 51 kDal) eingesetzt wird.

Das in einer 0,9%igen NaCl-Lösung resuspendierte Lyophilisat enthält ultraschallaktive Mikropartikel mit einem Durchmesser von 0,1 bis 8 µm.

Beispiel 11

Es wird wie in Beispiel (8) verfahren, wobei als Polymer 3,0 g Palmitoylmylopectin (Substitutionsgrad 30%, MW = 112 kDal) und als Lösungsmittel 40 ml Methylenchlorid eingesetzt wird. Das in einer 5,5%igen Mannitol-Lösung resuspendierte Lyophilisat enthält ultraschallaktive Mikropartikel mit einem Durchmesser von 0,3 bis 7 µm.

Beispiel 12

Es wird wie in Beispiel (11) verfahren, wobei als Polymer Palmitoylmylose (Substitutionsgrad 30%, MW = 100 kDal) und als Lösungsmittel 140 ml Methylenchlorid/Propylformiat (Volumenanteil 2 : 1) eingesetzt wird. Das in Wasser resuspendierte Lyophilisat enthält ultraschallaktive Mikropartikel mit einem Durchmesser von

Beispiel 13

Es wird wie in Beispiel (11) verfahren, wobei als Polymer 3,0 g Palmitoylmannan mit einem Substitutionsgrad von 35% eingesetzt wird.

Das in Wasser resuspendierte Lyophilisat enthält ultraschallaktive Mikropartikel mit einem Durchmesser von 0,1 bis 7 µm.

Beispiel 14

Es wird wie in Beispiel (11) verfahren, wobei als Polymer 3,0 g Palmitoylchitosan mit einem Substitutionsgrad von 35% eingesetzt wird.

Das in einer 0,9%igen NaCl-Lösung resuspendierte Lyophilisat enthält ultraschallaktive Mikropartikel mit einem Durchmesser von 0,1 bis 7 µm.

Patentansprüche

1. Mikropartikel zur Herstellung eines Präparates für die Ultraschalldiagnostik, bestehend aus hydrophobisierten Polysacchariden und einer bei Körpertemperatur gasförmigen Komponente.

2. Mikropartikel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als hydrophobisierte Polysaccharide Derivate der Hyaluronsäure, des Dextrans, des Pullans, des Amylopektins, der Amylose, des Mannans und/oder des Chitosans verwendet werden, wobei funktionelle Gruppen durch Propyl-, Isopropyl-, Butyl-, Isobutyl-, Pentyl-, Isopentyl-, Hexyl-, Octyl-, Decyl-, Dodecyl-, Palmitoyl-, Stearinoyl-, Lauryl- und/oder Benzylgruppen ganz oder teilweise verestert oder verethert sind.

3. Mikropartikel nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß 30 bis 100% der funktionellen Gruppen des Polysaccharids verestert oder verethert sind.

4. Mikropartikel nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die hydrophobisierten Polysaccharide ein Molekulargewicht von 10–250 kDalton haben.

5. Mikropartikel nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Partikel einen mittleren Partikeldurchmesser von 500 nm bis 10 µm aufweisen.

6. Mikropartikel nach einem der Ansprüche 1–5, dadurch gekennzeichnet, daß als bei Körpertemperatur gasförmige Komponente Luft, Stickstoff und Edelgase enthalten sind.

7. Mikropartikel nach einem der Ansprüche 1–6, dadurch gekennzeichnet, daß als gasförmige Komponente perfluorierte Verbindung enthalten sind.

8. Mikropartikel nach einem der Ansprüche 7, dadurch gekennzeichnet, daß als perfluorierte Verbindung Perfluoropentanon, Perfluorohexan, Perfluoro-1,3-dimethylcyclohexan, Perfluorocyclohexan, Perfluorodecalin und/oder Perfluoroether enthalten ist.

9. Mikropartikel nach einem der Ansprüche 1–8, dadurch gekennzeichnet, daß hydrophobisiertes Polysaccharid Hyaluronsäurebenzylester, Hyaluronsäurepentylester, Hyaluronsäurepalmitoylester, Hyaluronsäuredodecylester, Palmitoyldextran, Bernsteinsäuremono-N,N-bis(octadecyl)amin-dextran, Palmitoylpullan, Palmitoylmylopectin, Pal-

mitoilylamylose, Palmitoylmannan oder Palmitoylchitosan verwendet wird.

10. Ultraschallkontrastmittel enthaltend Mikropartikel nach einem der Ansprüche 1 bis 9 in einem physiologisch verträglichen flüssigen Suspensionsmedium gegebenenfalls mit den in der pharmazeutischen Technologie üblichen Zusätzen. 5

11. Ultraschallkontrastmittel nach Anspruch 10 enthaltend als physiologisch verträgliches Suspensionsmedium Wasser, wäßrige Lösungen eines oder mehrerer anorganischer Salze oder wäßrige Lösungen von Mono- oder Disacchariden, die gegebenenfalls zusätzlich eine oberflächenaktive Substanz aus der Gruppe der Polysorbate, Polysaccharide, Poloxamere® oder Poloxamine® sowie Polyvinylpyrrolidon, Saccharosemono- oder diester und/oder einen physiologisch verträglichen mehrwertigen Alkohol enthalten. 10 15

12. Ein Kit für die Herstellung eines Mikropartikel und Gas enthaltenden Ultraschallkontrastmittels bestehend aus 20

- a) einem ersten Behälter, versehen mit einem Verschuß, der die Entnahme des Inhalts unter sterilen Bedingungen ermöglicht und mit dem flüssigen Suspensionsmedium gefüllt ist und 25
- b) einem zweiten Behälter, versehen mit einem Verschuß, der die Zugabe des Suspensionsmediums unter sterilen Bedingungen ermöglicht, gefüllt mit Mikropartikeln nach einem der Ansprüche 1 bis 9 und einem Gas oder Gasgemisch welches identisch mit dem in den Mikropartikeln enthaltenen Gas ist, wobei das Volumen des zweiten Behälters so bemessen ist, daß das Suspensionsmedium des ersten Behälters vollständig im zweiten Behälter Platz findet. 30 35

13. Verfahren zur Herstellung eines Mikropartikel und Gas enthaltenden Kontrastmittels für die Ultraschalldiagnostik, dadurch gekennzeichnet, daß man Mikropartikel nach einem der Ansprüche 1 bis 9 mit einer physiologisch verträglichen Trägerflüssigkeit vereinigt und bis zum Entstehen einer homogenen Suspension schüttelt. 40

14. Verfahren zur Herstellung von Mikropartikeln nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß man das jeweilige Polymer, sowie gegebenenfalls eine oberflächenaktive Substanz in einem organischen Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemisch löst, in dieser Lösung eine Perfluoroverbindung oder Wasser dispergiert und anschließend diese Dispersion in Wasser, das gewünschtenfalls eine oberflächenaktive Substanz enthält, gibt und dispergiert, wobei das Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemisch durch Gaseinleitung und gegebenenfalls Anlegen eines Vakuums entfernt wird und abschließend die so erhaltene Suspension mit einem pharmazeutisch akzeptablen Kryo- 50 55

protektor vermischt und gefriergetrocknet.

60

65